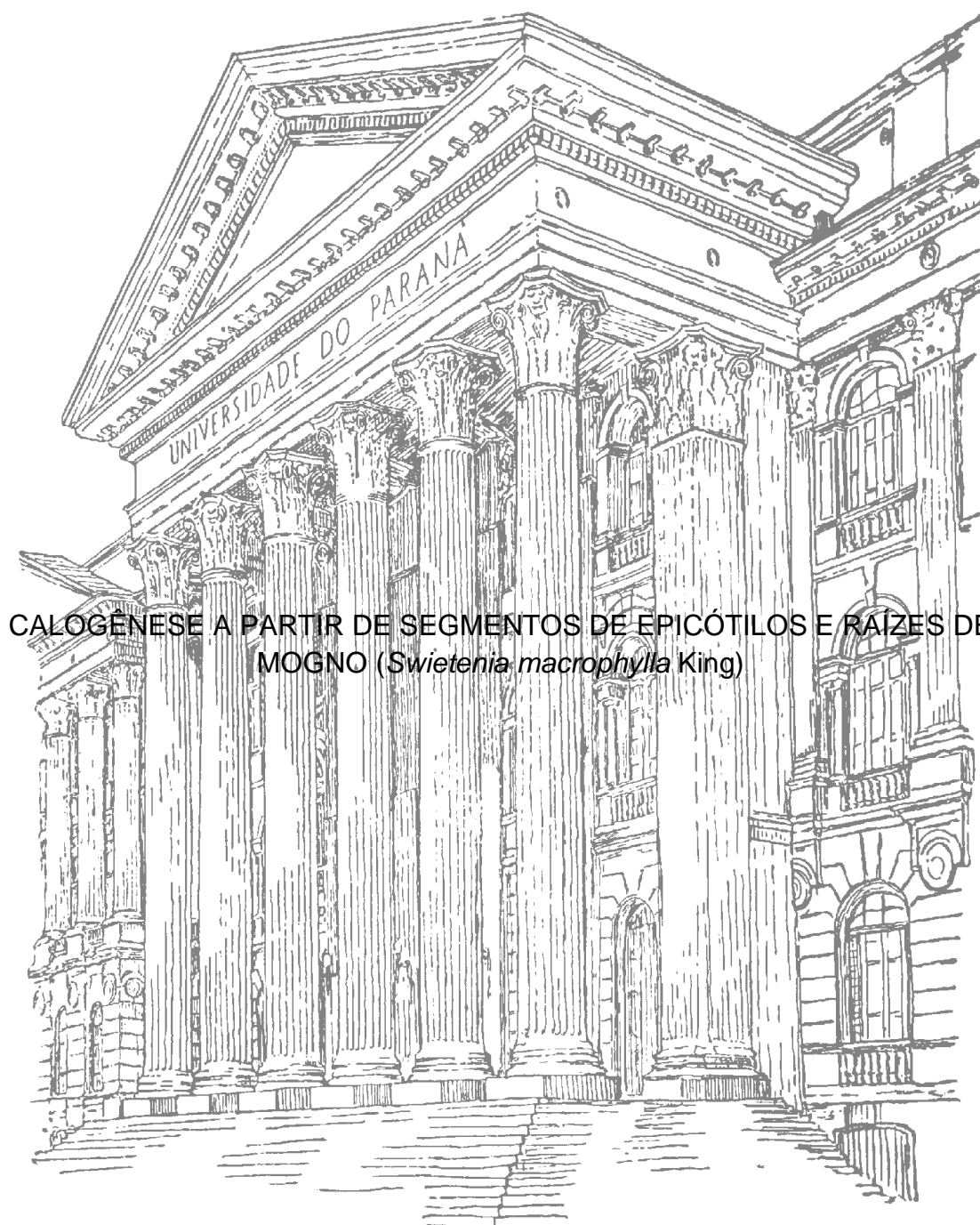


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO NOBUYA KATAYAMA GOBARA



CALOGÊNESE A PARTIR DE SEGMENTOS DE EPICÓTILOS E RAÍZES DE
MOGNO (*Swietenia macrophylla* King)

CURITIBA

2011

BRUNO NOBUYA KATAYAMA GOBARA

CALOGÊNESE A PARTIR DE SEGMENTOS DE EPICÓTILOS E RAÍZES DE
MOGNO (*Swietenia macrophylla* King)

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Botânica do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marguerite G. G. Quoirin
Coorientadora: Dr^a. Juliana Degenhardt -Goldbach

CURITIBA

2011

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares pelo apoio e paciência durante minha vida acadêmica.

Aos meus amigos de graduação e do laboratório de micropropagação vegetal, com os quais pude compartilhar experiências, momentos bons e ruins.

A professora Dr^a. Marguerite G. G. Quoirin pela ajuda e dedicação, incentivo, confiança, paciência e ensinamentos durante a orientação desta monografia.

A EMBRAPA Florestas (Colombo-PR) e a pesquisadora Dr^a. Juliana Degenhardt-Goldbach pelo apoio e fornecimento do material vegetal.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desta monografia.

“A natureza criou o tapete sem fim que recobre a superfície da terra. Dentro da pelagem desse tapete vivem todos os animais, respeitosamente. Nenhum o estraga, nenhum o rói, exceto o homem.”

Monteiro Lobato

“Turismo rende mais do que madeira.”

Rubem Duailibi

RESUMO

O mogno (*Swietenia macrophylla* King), pertencente à família Meliaceae, é uma espécie de grande importância econômica devido a sua madeira, utilizada na fabricação de móveis e artigos de decoração. O alto valor comercial do mogno estimula sua extração, fazendo que a espécie seja ameaçada de extinção. Diante da realidade apresentada e da importância da espécie, novas alternativas são necessárias para estabelecer uma estratégia de conservação e propagação. Ferramentas biotecnológicas, como a organogênese, podem ser empregadas para a sua conservação, a propagação em massa de genótipos de interesse e o melhoramento genético. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade de calogênese de segmentos de epicótilos e raízes provenientes de plântulas germinadas *in vitro*, como primeira etapa do processo de organogênese indireta. As sementes inicialmente tiveram seu tegumento retirado e foram desinfestadas com Cercobin (2 g.L⁻¹) por 40 min, etanol 70% com adição de Tween-20 (0,02%) por 1 min, NaOCl 2,5% por 20 min e três lavagens com água destilada estéril. Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em frascos contendo o meio básico MS (Murashige e Skoog, 1962) com 6 g.L⁻¹ de ágar. Explantes de epicótilos com 10 cm de comprimento e raízes com tamanho variado foram utilizados. Os epicótilos e raízes foram cortados em fatias de 5 mm de espessura e colocados em solução antioxidante [PVP (1 g.L⁻¹), ácido cítrico (25 mg. L⁻¹) e ácido ascórbico (250 mg.L⁻¹)], secos em papel toalha autoclavado e inoculados em placas contendo meio MS adicionado de picloram (0; 0,25; 0,5 e 1,0 µM) ou de ANA (0 e 0,1 µM) e TDZ (0; 0,5; 1,0 e 1,5 µM) ou de ANA 1,3 µM e BAP 4,4 µM. A indução de calogênese a partir de epicótilos foi observada em todos os tratamentos com fitorreguladores. A calogênese foi observada em 55 a 100% dos explantes de epicótilos. No caso dos explantes radiculares, a calogênese foi baixa e foi observada em 5 a 25% dos explantes. Outras combinações de fitorreguladores precisam ser testadas de maneira a induzir a organogênese.

Palavras-chave: ANA, Meliaceae, Picloram, TDZ.

SUMÁRIO

RESUMO	V
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A ESPÉCIE <i>Swietenia macrophylla</i> King	3
2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E EXPLORAÇÃO	4
2.3 MICROPROPAGAÇÃO.....	5
2.4 ORGANOGÊNESE	6
3. MATERIAL E MÉTODO	8
3.1 LOCAL DE TRABALHO	8
3.2 MATERIAL VEGETAL.....	8
3.3 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTURA.....	9
3.4 AVALIAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA	9
3.5 CALOGÊNESE EM EXPLANTES DE EPICÓTILOS.....	10
3.5.1 EFEITO DO PICLORAM.....	10
3.5.2 EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E TDZ	11
3.5.3 EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E BAP	12
3.6 CALOGÊNESE EM EXPLANTES RADICULARES.....	13
3.6.1 EFEITO DO PICLORAM.....	13
3.6.2 EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E TDZ	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 CALOGÊNESE EM EXPLANTES DE EPICÓTILOS.....	15
4.1.1 EFEITO DO PICLORAM.....	15
4.1.2 EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E TDZ	18
4.1.3 EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E BAP	22
4.2 CALOGÊNESE EM EXPLANTES RADICULARES.....	23
4.2.1 EFEITO DO PICLORAM.....	23
4.2.2 EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E TDZ	24
5. CONCLUSÕES	26
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
FIGURAS	30
ANEXOS	32

1. INTRODUÇÃO

Considerado o país que possui a maior biodiversidade do mundo, o Brasil tem sua riqueza natural constantemente ameaçada. Muitas espécies vegetais brasileiras já estão extintas em decorrência da exploração extremamente intensa e descontrolada nas últimas décadas.

O mogno (*Swietenia macrophylla* King), pertencente à família Meliaceae, é uma das espécies que corre o risco de extinção. Por seu valor comercial extraordinário, devido às suas características físicas e anatômicas, a espécie passa a ser uma das principais fontes de madeira para exportação nos trópicos da América Latina (NETO *et al.*, 2004).

Esta espécie está presente nas Américas Central e do Sul. No Brasil, ocorre no Pará, Maranhão, Tocantins, Mato Grosso, Rondônia, Acre e Amazonas (JUNIOR e GALVÃO, 2005). Sua ocorrência é abundante em terras úmidas, algumas vezes pantanosas, sendo, porém, frequente nas ribanceiras e ladeiras bem drenadas, que recebem alta precipitação. É uma árvore de grande porte, atingindo até 70 m de altura, o tronco ereto atinge até 3,5 m de diâmetro e 27 m de altura antes de formar galhos (CARVALHO, 2007). Sua propagação natural se dá por anemocoria e, no estágio adulto, esta espécie produz até 600 frutos ou 3.000 sementes por ano, com potencial germinativo de sementes frescas variando de 42% a 98%. (GULLISON *et al.*, 1996). Entretanto, esta espécie tem dificuldade de regenerar após práticas de exploração, que geralmente são seletivas e irracionais, que dizimam inúmeras árvores adultas, diminuindo e dificultando a disponibilidade de sementes (LOPES, 2000 *apud* COUTO, 2002).

A extração de mogno na Amazônia Brasileira vem sendo feita há muitos anos, porém sua intensa exploração é maior desde o início dos anos 1970. A importância comercial do mogno, juntamente com sua vulnerabilidade ecológica, tem sido objeto de intensa polêmica sobre como garantir a conservação e o uso sustentado dessa espécie (NETO *et al.*, 2004). Devido à exploração intensa, as reservas naturais de mogno vêm diminuindo cada vez mais, e por isso o governo decretou a Lei número 3.559, de 14 de agosto de 2000, que suspende na Região Amazônica a exploração da espécie pelo período de dois anos (BRASIL, 2000). A

continua exploração desta espécie, fez com que o governo brasileiro, pelo decreto nº 6.472, de 5 de junho de 2008, suspendesse definitivamente a exploração do mogno em território brasileiro, sendo a partir desse período expressamente proibido o abate de árvores da espécie *Swietenia macrophylla* King (mogno), inclusive em áreas nas quais seja autorizada a supressão de vegetação (BRASIL, 2008).

O incentivo ao reflorestamento seria a única maneira de evitar a extinção do mogno e o desaparecimento das reservas naturais desta espécie, mas os cultivos puros têm sido limitados devido aos ataques de larvas de *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae), que destroem a gema terminal das plantas jovens, acarretando a redução do vigor e a bifurcação do tronco (COUTO, 2002).

A procura por alternativas para o cultivo da espécie tem sido um grande desafio para os pesquisadores. A cultura de tecidos é uma alternativa para se obter um processo de propagação clonal em larga escala em um curto espaço de tempo. Esta técnica pode também ser utilizada para a obtenção de propágulos, principalmente de espécies florestais que apresentam problemas que vão da produção, armazenamento, germinação até as patologias das sementes (MARUYAMA *et al.*, 1989).

Ainda mediante esta técnica, novos genótipos poderão ser gerados após a inserção de genes nas células da planta, podendo-se obter plantas resistentes a insetos como *Hypsipyla grandella* Zeller.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade de calogênese de segmentos de epicótilos e raízes provenientes de plântulas de mogno germinadas *in vitro*. Uma vez obtida a regeneração de gemas a partir de calos, esta poderá ser utilizada posteriormente para o desenvolvimento de novos genótipos da espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A ESPÉCIE *Swietenia macrophylla* King

O mogno, que pertence à família Meliaceae, é uma árvore robusta que domina o dossel da floresta. Seu tronco em formato ereto pode atingir 3,5 m de diâmetro e uma altura total de 70 m e a copa chega a 40 m - 50 m de largura. As raízes tabulares são comuns e podem atingir até 5 m de comprimento na base. O tronco pode alcançar 25 m de altura antes de formar galhos (GROGAN *et al.*, 2002). Possui sapopemas basais, sua casca é parda avermelhada escura, inteiramente rosada, espessa, profundamente sulcada; quando jovem possui lenticelas; copa de folhagem densa, fortemente verde com ramificação pesada e bem distribuída (COUTO, 2002). O fruto é lenhoso, constituído por cápsula, ovóide, de coloração castanho-clara, com cerca de 12 a 18 cm de comprimento, que se abre em 5 partes, com 10 a 14 sementes aladas com comprimento de 8 a 11 cm cada uma (Figura 1B, 1C e 1D).

A área de ocorrência desta espécie estende-se do México, passando pela América Central, até um amplo arco ao sul da Amazônia, pela Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e a porção oriental da Amazônia Brasileira (JUNIOR e GALVÃO, 2005).

O mogno encontra-se geralmente nas florestas classificadas como tropicais secas, porém podendo ser encontrado em florestas úmidas e zonas subtropicais ocorrendo desde o nível do mar, na América Central, até 1.400 metros, no sopé dos Andes no Equador, Peru e Bolívia (GROGAN *et al.*, 2002).

Sua regeneração se dá em clareiras abertas na floresta. As sementes de mogno, por serem aladas, são dispersas pelo vento. Uma árvore adulta de mogno produz até 600 frutos por ano (GULLISON *et al.*, 1996). A maioria das sementes é dispersa até 80 m da árvore matriz, principalmente na direção dos ventos mais fortes e durante o final da estação seca, onde o potencial germinativo de sementes frescas varia de 42% a 98%. A germinação das sementes ocorre rapidamente no sub-bosque, após o início da estação chuvosa onde há evidência de que a espécie, além de ocorrer nos estágios iniciais de regeneração da Floresta Tropical, apresenta características que possibilitam sua ocorrência entre as espécies nos estágios

tardios da sucessão (CARVALHO, 2007). Entretanto, esta espécie tem dificuldade de regenerar após práticas de exploração, que geralmente são seletivas e irracionais, que dizimam inúmeras árvores adultas, diminuindo e dificultando a disponibilidade de sementes (LOPES, 2000 *apud* COUTO, 2002).

2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E EXPLORAÇÃO

O mogno possui uma madeira considerada “nobre”, de alta qualidade e é uma das espécies de maior valor madeireiro do mundo. Ela é moderadamente pesada, altamente resistente ao ataque de fungos e insetos, sendo fácil de trabalhar. É usada principalmente na fabricação de móveis de luxo e na construção civil.

Em 2001, o metro cúbico de mogno serrado de qualidade superior chegou a ser vendido por US\$ 1.200 (GROGAN *et al.*, 2002). Calcula-se que entre 1971 e 1990 pelo menos 3,1 milhões de metros cúbicos de mogno foram retirados da floresta amazônica para exportação. Segundo dados oficiais do governo brasileiro, o País exportou em 1993, 174 mil metros cúbicos de mogno. Cerca de 80% dessa madeira foi enviada aos Estados Unidos e à Inglaterra (MIRANDA e MIRANDA, 2000).

Por causa dessa importância, o mogno tem sido intensamente extraído nas últimas décadas em sua área de ocorrência natural. A exploração predatória do mogno representa uma ameaça à sobrevivência da espécie, podendo apresentar efeitos drásticos, desde a redução da população natural e conseqüentemente da sua variabilidade genética, até a extinção da espécie (ROCHA, 2002).

Devido à exploração intensa e à diminuição das reservas naturais, o governo brasileiro tomou medidas para a preservação desta espécie e, desde 2001, a exploração e comercialização do mogno vêm tendo rigorosa fiscalização pelo IBAMA.

Uma maneira de evitar sua extinção e o desaparecimento das reservas naturais seria o incentivo ao reflorestamento; entretanto, este tem sido limitado devido aos ataques severos de larvas de *Hypsipyla grandella* Zeller, que destroem a gema terminal das plantas jovens, acarretando a redução do vigor e a bifurcação do tronco (COUTO, 2002).

Diante da realidade apresentada e dada a importância da espécie para a produção de madeira de alto valor, são necessários estudos com o objetivo de desenvolver um método prático de propagação vegetativa, para estabelecer uma estratégia de conservação e reprodução do germoplasma de melhor qualidade (MIRANDA e MIRANDA, 2000). A micropropagação é uma alternativa para se obter o processo de propagação clonal em larga escala.

2.3 MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação é uma forma de propagação assexuada, em que se utilizam explantes do vegetal, os quais, por meio de divisões celulares induzidas por fitorreguladores, produzem grande quantidade de indivíduos, genética e fenotipicamente idênticos, podendo ser conduzida pela proliferação de gemas axilares, indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta e embriogênese somática, direta ou indireta (CARVALHO *et al.*, 2006). Essa técnica consiste em propagar plantas dentro de tubos de ensaio ou similares de vidro, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais, como luz, temperatura, oxigênio e gás carbônico. Neste ambiente, é utilizado um meio nutritivo que tenha sido definido anteriormente (TORRES *et al.*, 2000).

Esta técnica foi possibilitada graças à totipotência característica das células vegetais. Em outras palavras, isso significa dizer que toda célula vegetal viva, que possua um núcleo, possui a capacidade de fielmente reproduzir a morfologia da planta inteira da qual se origina (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A micropropagação *in vitro* é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto, haja vista permitir condições para se obter plantas de difícil propagação e de ciclos de vida longa, em menor espaço de tempo, comparativamente ao melhoramento convencional (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

2.4 ORGANOGÊNESE

A organogênese é uma técnica de cultura de tecidos que envolve uma variedade de seqüências complexas de desenvolvimento, resultantes da manipulação de partes das plantas (GEORGE, 1993). A organogênese direta, na qual não ocorre formação de calos, segundo Grattapaglia e Machado (1998), ocorre em tecidos que apresentam potencial morfogênico na planta *in vivo*, mas que não se expressam (como base de pecíolos em dicotiledôneas, base de folhas e segmentos de raízes) e a organogênese indireta ocorre quando as gemas são originadas de calos pré-formados.

A calogênese é um processo de grande importância para a obtenção de plantas por morfogênese indireta. Os calos podem apresentar células ou grupos de células que possuem centros ativos de divisão celular. Em condições adequadas, esses centros acabam sendo induzidos e se capacitam para produção de órgãos e, em alguns casos, essas células já possuem capacidade de produção de órgãos, necessitando somente estimulação para se desenvolver (ROCHA e QUOIRIN, 2004).

Devido à totipotência, ou capacidade das células vegetais formarem órgãos ou uma planta inteira (TORRES *et al.*, 2000), protocolos para obtenção de plantas com base em tecidos vegetais foram obtidos em inúmeras espécies. Entretanto, o que pode diferir no comportamento de células vegetais com a mesma composição genética é a competência das células-alvo (TORRES *et al.*, 2000). Estas células possuem capacidade para responder a estímulos específicos como, por exemplo, hormonal (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Os fitorreguladores são fundamentais para o estabelecimento da competência e a determinação (canalização para vias particulares do desenvolvimento), condições necessárias para a formação de meristemas caulinares e/ou radiculares (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Em tecidos utilizados como explantes, a desdiferenciação celular pode resultar na formação de calos com células ou grupos de células competentes (ROCHA e QUOIRIN, 2004). Quando calos são transferidos para meios indutores, tornam-se determinados, ou seja, comprometidos a um processo específico de desenvolvimento (TORRES *et al.*, 2000).

No que se refere ao cultivo *in vitro* do mogno, há poucos estudos, podendo-se citar autores como MARUYAMA *et al.* (1989), que obtiveram formação de brotações múltiplas a partir de segmentos nodais. MARUYAMA e ISHII (1997) obtiveram multiplicação, regeneração, enraizamento e embriogênese somática em segmentos de epicótilo e gemas apicais. VENKETESWARAN *et al.* (1988) observaram a formação de calos a partir de segmentos cotiledonares e estabeleceram um protocolo de micropropagação por proliferação de gemas axilares. CERDAS *et al.* (1998), utilizando epicótilos de mudas de mogno, observaram a formação de gemas adventícias capazes de se desenvolver em brotos.

Além disso, vários autores relatam a formação de calos a partir de hipocótilos e segmentos caulinares (LEE e RAO, 1988), segmentos nodais, discos foliares, gemas apicais, gemas laterais (ALBARRAN *et al.*, 1997), segmentos de epicótilos (COUTO, 2002; BRUNETTA *et al.*, 2006), fragmentos foliares e raízes (ROCHA e QUOIRIN, 2004).

Além do mogno, outras espécies da família Meliaceae tiveram seus tecidos cultivados *in vitro*, como *Naregamia alata*, *Azadirachta excelsa* e *Azadirachta indica* ("neem") (SHAJI *et al.*, 1997; SALVI *et al.*, 2001; GIAGNACOVO *et al.*, 2001; SRIVASTAVA *et al.*, 2009). Foram cultivados folhas, raízes e ovários, servindo de base para a obtenção de calos e, em alguns casos, de brotos. No caso de *Cedrela odorata* (cedro), foram cultivados segmentos nodais e de hipocótilos para obtenção e multiplicação de brotos (CERDAS *et al.*, 1998; PENA-RAMIREZ *et al.*, 2010). Em *Cedrela fissilis* Vellozo (NUNES *et al.*, 2002) e *Melia azedarach* L. (HUSAIN e ANIS, 2009), foram realizados experimentos de micropropagação a partir de segmentos nodais, obtendo-se multiplicação, enraizamento e formação de calos friáveis, e em *Toona ciliata* (MROGINSKI *et al.*, 2003), segmentos uninodais foram utilizados como explantes para regeneração de plântulas.

O estudo dos processos de indução de calogênese, multiplicação e regeneração de gemas adventícias com base em explantes de segmentos de epicótilos e raízes pode levar ao desenvolvimento de protocolo de organogênese indireta de mogno. Uma vez obtido este protocolo, poderá ser utilizado para o desenvolvimento de novos genótipos por transformação genética, ou para micropropagação da espécie.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 LOCAL DE TRABALHO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal, no Departamento de Botânica, localizado no setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.2 MATERIAL VEGETAL

3.2.1 Sementes

Para a realização dos experimentos, sementes maduras de mogno (*Swietenia macrophylla* King), fornecidas pela EMBRAPA Florestas (Colombo, Brasil), foram germinadas *in vitro*. As sementes tiveram seu tegumento retirado (Figura 1E) e foram desinfestadas com Cercobin (2 g.L⁻¹) por 40 min; etanol 70% com adição de Tween-20 (0,02%) por 1 min; NaOCl 2,5% por 20 min e três lavagens com água destilada estéril. Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em frascos contendo meio básico MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com 6 g.L⁻¹ de ágar Vetec (Figura 2A). A germinação foi feita em sala de crescimento com temperatura de 27± 2°C de dia e de 18± 1°C de noite, em fotoperíodo de 16 horas sob luz fluorescente do tipo branca fria com fluxo de fótons de aproximadamente 30 μmol.m⁻².s⁻¹ (Figura 2B e 2C).

3.2.2 Fontes de explantes

Dois tipos de explantes foram utilizados: fragmentos de 10 cm de epicótilos oriundos de mudas com 30 e 60 dias de germinação *in vitro* (Figura 2D) e fragmentos de raízes (Figura 2J) de mudas com 30 dias de germinação *in vitro*, não tendo um padrão a ser seguido, uma vez que cada muda apresentava um comprimento de raiz diferente.

3.3 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTURA

O meio básico utilizado para todos os experimentos foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de ágar Vetec. Os meios tiveram seu pH ajustado em 5,8 com NaOH 1N ou HCL 1N antes de serem autoclavados a 120°C por 20 minutos.

Os fatores estudados foram a concentração e o tipo de fitorregulador e o tipo de explante. Foram testadas combinações de fitorreguladores [ácido naftalenoacético (ANA), tidiazuron (TDZ), 6-benzilaminopurina (BAP)] e picloram sozinho.

Epicótilos e raízes foram cortados em fatias de 5 mm de espessura, sendo mergulhados numa solução antioxidante esterilizada por filtração [PVP (1g.L⁻¹), ácido cítrico (25 mg.L⁻¹) e ácido ascórbico (250 mg.L⁻¹)] e depois os segmentos foram secos em papel toalha autoclavado.

Os explantes foram colocados em placas de Petri (95 x 20 mm) contendo 20 ml de meio de cultivo. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura em torno de 27± 2°C de dia e de 18± 1°C de noite, sendo o primeiro mês no escuro, e em seguida em fotoperíodo de 16 h sob luz fluorescente do tipo branca fria com fluxo de fótons de aproximadamente 2,5 μmol.m⁻².s⁻¹.

3.4 AVALIAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Calos obtidos foram avaliados, considerando os seguintes critérios: número de explantes produzindo calos, coloração dos calos e tipo de calo (friáveis ou compactos). A percentagem de explantes com calos foi obtida pela divisão do número de explantes com calos (N1) pelo número total de explantes (N2).

Para a análise dos dados, foi utilizado o programa estatístico (Assistat 7.6) e foi realizada a análise de variância (ANOVA), com transformação dos dados em ($\sqrt{X+0.5}$), quando o coeficiente de variação se encontrava elevado, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

3.5 CALOGÊNESE EM EXPLANTES DE EPICÓTILOS

Todos os experimentos e meios de cultura correspondentes estão indicados na Tabela 1.

3.5.1 EFEITO DO PICLORAM

Experimento 1

Epicótilos de mudas com aproximadamente 10 cm de comprimento foram retirados das sementes com auxílio de pinça e bisturi. As sementes foram mantidas *in vitro* para a formação de novos brotos. O epicótilo retirado foi cortado em segmentos de 5 mm de espessura. Em seguida, os segmentos foram inoculados no meio de cultura MS adicionado de picloram (0,25; 0,5 e 1,0 μM). O controle foi um meio sem picloram. Os explantes foram avaliados quanto a calogênese, aspecto e coloração do calo após 30 dias, sendo após transferidos para o meio básico contendo 4,4 μM de BAP, permanecendo por mais 30 dias sendo avaliados novamente. A seguir foram repicados para o mesmo meio.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, 7 placas de Petri por tratamento, sendo que cada placa possuía 6 explantes ($n = 42/\text{tratamento}$).

Experimento 2

Repetição do experimento 1, com a exceção de que os explantes, após serem avaliados aos 30 dias, foram transferidos para o meio contendo 1,3 μM de ANA e 4,4 μM de BAP, permanecendo por mais 30 dias, sendo avaliados quanto a calogênese, aspecto e coloração dos calos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, 8 placas por tratamento, sendo que cada placa possuía 6 explantes ($n = 48/\text{tratamento}$).

3.5.2 EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E TDZ

Experimento 1

Epicótilos foram retirados das mudas e as sementes foram mantidas *in vitro* para a formação de novos brotos. Os segmentos de epicótilo foram inoculados no meio de cultura MS adicionado de três combinações de ANA (0,1 μM) e TDZ (0,5; 1,0 ou 1,5 μM). O controle foi o meio de cultura MS sem fitorregulador. Os explantes foram avaliados quanto à calogênese, aspecto e coloração dos calos após 30 e 60 dias, sendo depois transferidos para os mesmos meios, permanecendo por mais 30 dias. A seguir foram subcultivados para o meio contendo 1,3 μM de ANA e 0,5 μM de TDZ, ficando nesse meio por 60 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, 6 placas de Petri por tratamento, sendo que cada placa possuía cinco explantes (n= 30/tratamento)

Experimento 2

Procedimento idêntico ao experimento 1. Após 60 dias, foram transferidos para o meio contendo 0,1 μM de ANA e 0,5 μM de TDZ, permanecendo por mais 30 dias. Os explantes foram avaliados quanto à calogênese, aspecto e coloração dos calos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, 10 placas por tratamento, sendo que cada placa possuía 6 explantes (n= 60/tratamento)

Experimento 3

Repetição do experimento 1, com a exceção de que os explantes, após 30 dias, foram transferidos para os meios com 0,1 μM de ANA e concentrações de

0,5; 1,0 e 1,5 μM de TDZ, permanecendo por mais 30 dias. Os explantes foram avaliados quanto à calogênese, aspecto e coloração dos calos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, 7 placas de Petri por tratamento, sendo que cada placa possuía 5 explantes ($n = 35/\text{tratamento}$).

3.5.3 EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E BAP

Experimento 1

Segmentos de epicótilos com 5 mm de espessura foram inoculados no meio de cultura MS adicionado de 0,1 μM de ANA e 2,2 μM de BAP.

Os explantes foram avaliados após 30 e 60 dias, sendo depois transferidos para o meio contendo 1,3 μM de ANA e 4,4 μM de BAP, permanecendo por mais 30 dias, onde foram avaliados quanto a calogênese, aspecto e coloração dos calos, sendo a seguir subcultivados para o mesmo meio.

Experimento 2

O primeiro meio de cultura foi o mesmo do experimento 1. Após 30 dias, os explantes foram transferidos para o mesmo meio de cultura mencionado no experimento 1 e foram avaliados quanto a calogênese, aspecto e coloração dos calos.

Experimento 3

Segmentos de epicótilos de 5 mm de espessura foram inoculados no meio de cultura adicionado de 1,3 μM de ANA e 4,4 μM de BAP. Os explantes ficaram por 30 dias, sendo subcultivados para o mesmo meio depois de 30 dias. As avaliações foram realizadas aos 30, 60 e 90 dias de cultura, sendo avaliados quanto à calogênese, aspecto e coloração dos calos.

Delineamento experimental para os experimentos 1, 2 e 3: para cada experimento foram utilizadas 10 placas de Petri com 6 explantes por placa (n=60/tratamento).

3.6 CALOGÊNESE EM EXPLANTES RADICULARES

Todos os experimentos e meios de cultura correspondentes estão indicados na Tabela 1.

3.6.1 EFEITO DO PICLORAM

Experimento 1

Foram utilizadas raízes com tamanho variável, excisadas de mudas cultivadas *in vitro*. As raízes foram cortadas em segmentos de 5 mm de comprimento, inoculados em meio de cultura MS adicionado de 0,25; 0,5 ou 1,0 μM de picloram. O controle foi o meio de cultura sem picloram. Os explantes foram avaliados quanto a calogênese, aspecto e coloração dos calos após 30 e 60 dias e depois transferidos para o meio contendo 0,6 μM de ANA e 4,4 μM de BAP, permanecendo por mais 30 dias.

Experimento 2

Repetição do experimento 1, com a diferença de que os explantes, após serem avaliados aos 30 dias, foram transferidos para o meio contendo 0,6 μM de ANA e 2,2 μM de BAP, permanecendo por mais 30 dias. Os explantes foram avaliados quanto à calogênese, aspecto e coloração dos calos.

Nos dois experimentos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos, 8 placas de Petri por tratamento, sendo que cada placa possuía 6 explantes (n= 48/tratamento).

3.6.2 EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E TDZ

As raízes foram cortadas em segmentos de 5 mm de comprimento que foram em seguida inoculados nos meios de cultura MS contendo 0,1 μM de ANA em combinação com 0,5; 1,0 ou 1,5 μM de TDZ, com 10 placas de Petri por meio e 6 explantes por placa ($n=60/\text{tratamento}$). O controle foi o meio de cultura sem fitorregulador.

Os explantes foram avaliados quanto à calogênese, aspecto e coloração dos calos após 30 e 60 dias, sendo depois transferidos para o meio contendo 0,1 μM de ANA e 0,5 μM de TDZ, permanecendo por mais 60 dias. O experimento foi repetido uma vez.

TABELA 1. ORIGEM DOS EXPLANTES, MEIOS DE CULTURA INICIAIS E MEIOS DE SUBCULTURAS APLICADOS NOS EXPERIMENTOS DE CALOGÊNESE EM MOGNO.

Explante	Fitorregulador	Experimento	Meio Inicial	Meio Subcultura
Epicótilos	picloram	1	0; 0,25; 0,5 e 1,0 μM de picloram	4,4 μM de BAP
		2	0; 0,25; 0,5 e 1,0 μM de picloram	1,3 de μM ANA + 4,4 μM de BAP
	ANA + TDZ	1	0,1 de μM ANA + (0; 0,5; 1,0 e 1,5 μM) de TDZ	1,3 de μM ANA + 0,5 μM de TDZ
		2	0,1 de μM ANA + (0; 0,5; 1,0 e 1,5 μM) de TDZ	0,1 de μM ANA + 0,5 μM de TDZ
		3	0,1 de μM ANA + (0; 0,5; 1,0 e 1,5 μM) de TDZ	0,1 de μM ANA + (0,5; 1,0 e 1,5 μM) de TDZ
	ANA + BAP	1	0,1 de μM ANA + 2,2 μM de BAP	1,3 de μM ANA + 4,4 μM de BAP
		2	0,1 de μM ANA + 2,2 μM de BAP	1,3 de μM ANA + 4,4 μM de BAP
		3	1,3 de μM ANA + 4,4 μM de BAP	1,3 de μM ANA + 4,4 μM de BAP
Raízes	picloram	1	0; 0,25; 0,5 e 1,0 μM de picloram	0,6 de μM ANA + 4,4 μM de BAP
		2	0; 0,25; 0,5 e 1,0 μM de picloram	0,6 de μM ANA + 2,2 μM de BAP
	ANA + TDZ	1	0,1 de μM ANA + (0; 0,5; 1,0 e 1,5 μM) de TDZ	0,1 de μM ANA + 0,5 μM de TDZ
		2	0,1 de μM ANA + (0; 0,5; 1,0 e 1,5 μM) de TDZ	0,1 de μM ANA + 0,5 μM de TDZ

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CALOGÊNESE EM EXPLANTES DE EPICÓTILOS

4.1.1 EFEITO DO PICLORAM

Experimento 1.

A percentagem de explantes apresentando calos foi maior nos meios contendo picloram, sendo significativamente superior ao controle (Tabela 2). No meio de cultura sem picloram, obteve-se 11% de calogênese, em quanto que, nos meios contendo picloram, 59 a 81% dos explantes formaram calos, de coloração branco-amarelada e consistência compacta. A análise de variância (Anexo 1) foi significativa para a calogênese de explantes de epicótilo cultivados na presença de diferentes concentrações de picloram em comparação com o controle.

TABELA 2. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM ANTES E APÓS TRANSFERÊNCIA PARA MEIO COM 4,4 μM BAP NA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES DE EPICÓTILO DE MOGNO APÓS 30 DIAS EM CADA MEIO.

picloram (μM)	% explantes com calos (N1/N2)	% explantes com calos (N1/N2) em meio com 4,4 μM BAP
0,0	11 b (4/37)	11 b (4/37)
0,25	81 a (30/37)	83 a (31/37)
0,5	59 a (22/37)	65 a (24/37)
1,0	78 a (29/37)	78 a (29/37)

N1= número de explantes com calos ; N2= número total de explantes. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Aos 60 dias, depois dos explantes serem transferidos para o meio com 4,4 μM de BAP, foi observado que o número de calos continuou aproximadamente igual com uma pequena variação, quando comparado com o meio anterior, mostrando que a mudança de explantes para o meio com BAP não interferiu no desenvolvimento dos calos e não induziu a diferenciação em gemas ou raízes (Tabela 2). A análise de variância (Anexo 2) foi significativa para a calogênese de

explantes de epicótilo cultivados na presença de diferentes concentrações de picloram comparado com o controle. Quanto à coloração e ao aspecto dos calos aos 60 dias, estes se apresentavam em sua maioria com uma coloração bege e marrom, com aspecto compacto.

Experimento 2.

No experimento 2, foi verificado que, após 30 dias, a percentagem de explantes com calos foi maior nos meios contendo picloram, não havendo diferença estatística entre os tratamentos, mas sim entre esses tratamentos e o controle. Em meio com picloram, obteve-se de 93 a 100% de calogênese, sem diferença significativa entre as concentrações (Tabela 3). Quanto à coloração e ao aspecto dos calos aos 30 dias, estes apresentavam em sua maioria uma cor amarela e aspecto compacto. A análise de variância (Anexo 3) também foi significativa para a calogênese de explantes de epicótilo em presença de picloram em comparação com o controle.

TABELA 3. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM NA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES DE EPICÓTILO DE MOGNO APÓS 30 DIAS.

picloram (μM)	% explantes com calos (N1/N2)
0,0	24 b (11/45)
0,25	100 a (45/45)
0,5	100 a (45/45)
1,0	93 a (42/45)

N1= número de explantes com calos ; N2= número total de explantes. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Aos 60 dias, após a transferência dos explantes para o meio com 1,3 μM de ANA e 4,4 μM de BAP, foi observado que o número de explantes com calos continuou igual, quando comparado com o meio anterior, mostrando que a transferência de explantes para o meio com ANA e BAP, não interferiu na calogênese. Quanto à coloração e ao aspecto dos calos aos 60 dias, estes se

apresentavam em sua maioria com uma coloração bege e marrom e aspecto compacto (Figura 2F).

Neste experimento o meio de cultura MS acrescido de picloram, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 μM proporcionaram a formação de calos, porém não foram observadas diferenças significativas quanto à porcentagem de formação de calos em função dos níveis de picloram. Verificou-se que a utilização de auxina foi favorável ao desenvolvimento de calos, uma vez que explantes cultivados em meio sem fitorregulador apresentaram baixa ou nenhuma formação de calos, resultado semelhante ao encontrado por COUTO (2002) em explantes foliares de mogno, em que foram testadas as concentrações de 0; 2,5; 5; 10 e 20 μM de picloram, não houve resposta morfogênica dos explantes foliares ao meio sem adição do regulador de crescimento. COUTO (2002) obteve maiores números de formação de calos (75%) em tratamento contendo 10 μM de picloram, onde foi observado calos compactos creme escuro ao longo do explante e células compactas de coloração branca. No meio contendo 5 μM de picloram, o mesmo autor observou respostas diferentes, onde os calos produzidos apresentaram coloração creme escuro ao longo do explante, calos transparentes na nervura, calos compactos translúcidos ou de coloração branca.

A diferença no resultado de calogênese, entre os experimentos 1 e 2, provavelmente foi devido à diferença de idade dos explantes utilizados. As idades dos explantes foram 60 e 30 dias, respectivamente, e o maior número de calos foi obtido nos explantes que foram retirados de plantas mais jovens (30 dias).

Após a transferência dos calos para os meio contendo 4,4 μM de BAP sozinho ou combinado com 1,3 μM de ANA, não houve diferença na calogênese, podendo-se observar que o picloram tem grande potencial na indução inicial de calos. Entretanto, a utilização de outros tipos de fitorreguladores no subcultivo é de extrema importância para a organogênese, uma vez que foi observado que calos cultivados somente em meio com picloram podem acabar perdendo sua potencialidade de divisão e consequentemente sua diferenciação em gemas e brotações.

4.1.2 EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E TDZ

Experimento 1.

Na avaliação dos explantes após 30 dias, pode-se observar que a calogênese apresentou-se em maior quantidade nos meios contendo os fitorreguladores ANA e TDZ, não havendo diferença estatística entre os tratamentos, mas sim entre esses tratamentos e o controle (Tabela 4). No tratamento controle, observou-se baixa taxa de calogênese; enquanto que no meio com 0,5; 1,0 e 1,5 μM de TDZ não houve diferença estatística entre os tratamentos, como pode ser visto na Tabela 4. Cerca de 18% dos explantes em meio sem fitorregulador apresentaram calos, enquanto que, nos meios contendo ANA e TDZ, a formação de calos a partir de epicótilos variou de 73 a 91%, com obtenção um pouco melhor de calogênese (91%) em meio com 1,0 μM de TDZ. Os calos tinham coloração bege e amarela e aparência translúcida com aspecto compacto.

Na avaliação dos explantes após 30 dias, foi verificado que a análise de variância (Anexo 4) foi significativa para a calogênese de explantes de epicótilo em meio sem fitorregulador comparado com explantes em meio com 0,1 μM de ANA combinado com as concentrações 0,5; 1,0 e 1,5 μM de TDZ.

TABELA 4. EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E TDZ NA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES DE EPICÓTILO DE MOGNO APÓS 30 DIAS.

ANA (μM)	TDZ (μM)	% explantes com calos (N1/N2)
0	0	18 b (4/22)
0,1	0,5	82 a (18/22)
0,1	1,0	91 a (20/22)
0,1	1,5	73 a (16/22)

N1= número de explantes com calos ; N2= número total de explantes. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Após a transferência dos explantes para o meio com 1,3 μM de ANA e 0,5 μM de TDZ, a quantidade de calos continuou a mesma vista inicialmente; entretanto, esses calos aumentaram de tamanho e passaram a apresentar uma coloração bege e aspecto compacto, sendo alguns com aspecto friável. Após 30 dias neste meio, alguns calos começaram a apresentar coloração esverdeada.

Experimento 2.

Após os 60 dias iniciais, a presença de calos foi observada em maior quantidade nos meios contendo os fitorreguladores ANA e TDZ, não havendo diferença estatística entre os tratamentos, mas sim entre esses tratamentos e o controle (Tabela 5). No meio de cultura sem ANA e TDZ, obteve-se 17% de calogênese, em quanto que, nos meios contendo esses fitorreguladores, 54 a 61% dos explantes formaram calos de coloração bege e amarelo e aparência translúcida com aspecto compacto (Figura 2G).

Na avaliação dos explantes após 60 dias, foi verificado que a análise de variância (Anexo 5) foi significativa na calogênese de explantes de epicótilo em meio sem fitorregulador comparado com explantes em meio com 0,1 μM de ANA combinado com as concentrações 0,5; 1,0 e 1,5 μM de TDZ. A formação de calos em meio contendo ANA e TDZ não apresentou diferença estatística (Tabela 5).

TABELA 5. EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E TDZ NA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES DE EPICÓTILO DE MOGNO APÓS 60 DIAS.

ANA (μM)	TDZ (μM)	% explantes com calos (N1/N2)
0	0	17 b (9/54)
0,1	0,5	54 a (29/54)
0,1	1,0	54 a (29/54)
0,1	1,5	61 a (33/54)

N1= número de explantes com calos ; N2= número total de explantes. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Após a transferência dos explantes para o meio com 0,1 μM de ANA e 0,5 μM de TDZ, após 30 dias, a quantidade de calos aumentou nos três tratamentos com ANA e TDZ, com 70 a 80% dos explantes formando calos, porém o tratamento sem fitorregulador apresentou a mesma quantidade inicial de calos (Tabela 6). Os calos também aumentaram de tamanho e passaram a apresentar uma coloração mais bege e um aspecto compacto. Quanto à formação de calos no subcultivo em meio com 0,1 μM de ANA e 0,5 μM de TDZ, não houve diferença estatística entre os três tratamentos, mas sim entre esses tratamentos e o controle (Tabela 6). Na avaliação

dos explantes após 30 dias, foi verificado que a análise de variância (Anexo 6) foi significativa para a calogênese de explantes de epicótilo em meio sem fitorregulador comparado com explantes em meio com 0,1 μM de ANA combinado com as concentrações 0,5; 1,0 e 1,5 μM de TDZ.

TABELA 6. FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES DE EPICÓTILO DE MOGNO EM MEIOS CONTENDO ANA e TDZ, APÓS 30 DIAS.

ANA / TDZ (μM) (meio de introdução)	ANA / TDZ (μM) (1ª subcultura)	% explantes com calos (N1/N2)
0 / 0	0,1 / 0,5	17 b (9/54)
0,1 / 0,5	0,1 / 0,5	70 a (38/54)
0,1 / 1,0	0,1 / 0,5	80 a (43/54)
0,1 / 1,5	0,1 / 0,5	76 a (41/54)

N1= número de explantes com calos ; N2= número total de explantes. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Experimento 3.

Novamente, a presença de calos após 30 dias iniciais foi observada em maior quantidade nos meios contendo ANA e TDZ, não havendo diferença estatística entre os tratamentos; entretanto houve diferença entre esses tratamentos e o controle (Tabela 7). Em meio controle, observou-se baixa taxa de calogênese (33%); enquanto que no meio com 0,5; 1,0 e 1,5 μM de TDZ, a calogênese variou de 93 a 100%. Com relação aos calos, estes apresentaram coloração bege e amarela e aparência translúcida com aspecto compacto.

Na avaliação dos explantes após 30 dias, foi verificado que a análise de variância (Anexo 7) foi significativa na calogênese de explantes de epicótilo em meio sem fitorregulador comparado com explantes em meio com 0,1 μM de ANA combinado com 0,5; 1,0 e 1,5 μM de TDZ.

TABELA 7. EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E TDZ NA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES DE EPICÓTILO DE MOGNO APÓS 30 DIAS.

ANA (μM)	TDZ (μM)	% explantes com calos (N1/N2)
0	0	33 b (10/30)
0,1	0,5	100 a (30/30)
0,1	1,0	93 a (28/30)
0,1	1,5	100 a (30/30)

N1= número de explantes com calos ; N2= número total de explantes. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nos três experimentos foi observado que em meio controle, a taxa de calogênese foi baixa, em comparação a calogênese apresentada em meios contendo ANA e TDZ. Em relação às combinações dos fitorreguladores, não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de TDZ para a indução de calogênese.

Nestes três experimentos, o meio de cultura MS acrescido da combinação de 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ proporcionou a maior percentagem de explantes com calos, sendo estes de coloração bege, amarela e aparência translúcida com aspecto compacto. Este resultado difere do resultado encontrado por ALBARRÁN *et al.* (1997) que utilizaram segmentos foliares de mogno com explantes e obtiveram a maior formação de calos no meio MS com a metade da sua concentração de sais, adicionado de baixa concentração (0,09 μM) de TDZ em combinação com 22,6 μM de 2,4-D.

Na totalidade dos explantes inoculados no meio sem fitorregulador, observou-se pouca formação de calos, os quais apresentaram textura compacta de coloração bege, porém não se desenvolveram. Esses resultados estão de acordo com os de BRUNETTA *et al.* (2006) que observaram baixa frequência de calogênese em explantes de epicótilo de *Swietenia macrophylla* King em meio de cultura sem fitorregulador.

Após a transferência dos calos para o meio contendo 1,3 μM de ANA e 0,5 μM de TDZ, não houve diferença na formação de calos, mas eles aumentaram de tamanho e passaram de uma coloração amarela para bege, alguns com aspecto compacto e outros de aspecto friável. Entretanto, quando foram transferidos para o meio contendo 0,1 μM de ANA e 0,5 μM de TDZ, observou-se um aumento na quantidade de calos por explante e no tamanho desses calos, continuando a

apresentar uma coloração bege e um aspecto compacto. Esses resultados estão de acordo com os de COUTO (2002); ROCHA e QUOIRIN (2004) e BRUNETTA *et al.* (2006), que observaram que a baixa concentração de ANA, combinada com uma concentração média ou alta de citocinina, resulta em maior obtenção de calos em explantes de epicótilos ou de raízes.

4.1.3 EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E BAP

Na avaliação inicial dos explantes após 30 dias, a calogênese foi observada nos três experimentos com ANA e BAP, diferindo apenas a taxa de calogênese (Tabela 8). Essa diferença entre os experimentos foi devida à idade dos explantes utilizados nos experimentos, onde foram utilizadas plantas de 30 dias (experimento 2 e 3) e 60 dias (Experimento 1) na instalação do experimento. Com relação à coloração e aparência dos calos, estes se apresentaram inicialmente sob coloração bege e amarelo e aparência compacta e translúcida (Figura 2H).

Em relação ao subcultivo em meio contendo 1,3 μM de ANA e 4,4 μM de BAP, verificou-se que após 30 dias, a percentagem de formação de calos aumentou nos tratamentos iniciais com 0,1 μM de ANA e 2,2 μM de BAP, onde inicialmente a calogênese nos dois experimentos foi de 68 a 88% e passou para uma proporção de 83 a 100% após o subcultivo. A formação de calos se manteve constante (68%) nos explantes que em meio inicial foram cultivados com 1,3 μM de ANA e 4,4 μM de BAP, e subcultivados para este mesmo meio (Tabela 8).

Com relação a coloração e aparência dos calos, eles aumentaram de tamanho e passaram a apresentar uma coloração bege e aspecto compacto e alguns um aspecto friável. Calos cultivados em meio com 0,1 μM de ANA e 2,2 μM de BAP começaram a apresentar uma coloração esverdeada (Figura 2I).

TABELA 8. EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E BAP NO CULTIVO DE EXPLANTES DE EPICÓTILO DE MOGNO

Experimentos	Concentração (em μM) ANA / BAP (meio inicial)	% explantes com calos após 30 d.	Concentração (em μM) ANA / BAP (1ª subcultura)	% explantes com calos após 30 d.
1**	0,1 / 2,2	68 (41/60)	1,3 / 4,4	83 (50/60)
2*	0,1 / 2,2	88 (53/60)	1,3 / 4,4	100 (60/60)
3*	1,3 / 4,4	68 (41/60)	1,3 / 4,4	68 (41/60)

*plantas de 30 dias; **plantas de 60 dias

Nos explantes em meio contendo 1,3 μM de ANA e 4,4 μM de BAP, foi observada uma grande quantidade de calos (68%) como observado por BRUNETTA *et al.* (2006) com as mesmas concentrações de ANA e BAP. Após 30 dias em meio de subcultura, explantes cultivados inicialmente em presença de 0,1 μM de ANA e 2,2 μM de BAP que passaram para o meio com 1,3 μM de ANA e 4,4 μM de BAP, tiveram a taxa de calogênese aumentada; enquanto explantes em meio com 1,3 μM de ANA e 4,4 μM de BAP não apresentaram aumento na calogênese.

Neste experimento, os explantes de epicótilo responderam de forma diferenciada aos tratamentos de combinações dos fitorreguladores ANA e BAP, com os maiores números de calos ocorrendo para o tratamento contendo inicialmente 0,1 μM de ANA e 2,2 μM de BAP, e subcultura em meio contendo 1,3 μM de ANA e 4,4 μM de BAP.

O resultado é semelhante ao apresentado por NUNES *et al.* (2002), que em estudos a partir de nó cotiledonar de *Cedrela fissilis* Vellozo, obtiveram respostas diferenciadas com combinações de ANA e BAP, observando alta taxa de calogênese em meio MS suplementado com BAP nas concentrações de 1,25; 2,5 ou 5,0 μM combinada respectivamente com 2,5 ou 5,0 μM de ANA.

4.2 CALOGÊNESE EM EXPLANTES RADICULARES

4.2.1 EFEITO DO PICLORAM

A análise de variância (Anexo 8) não foi significativa para a calogênese de explantes radiculares cultivados na presença de diferentes concentrações de picloram. A taxa de calogênese apresentou-se baixa e sem diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 9). Os calos se apresentavam de coloração marrom escuro e de aspecto compacto (Figura 2L).

TABELA 9. EFEITO DO PICLORAM NA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES RADICULARES DE MOGNO APÓS 30 DIAS.

picloram (μM)	% explantes com calos (N1/N2)
0,0	8 (8/96)
0,25	19 (18/96)
0,5	23 (23/96)
1,0	14 (13/96)

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Quando os explantes foram transferidos para os meios 0,6 μM de ANA e 4,4 μM de BAP e 0,6 μM de ANA e 2,2 μM de BAP e permaneceram nestes meios por 30 dias, o resultado foi apenas o aumento do volume de alguns calos.

4.2.2 EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E TDZ

Após 30 dias, observou-se que o número de calos foi pequeno e, em meio sem regulador vegetal, não houve formação de calos. A taxa de calogênese em explantes radiculares apresentou-se baixa e não significativa, com a maior taxa de 15% no meio constituído por 0,1 μM de ANA e 0,5 μM de TDZ (Tabela 10). Os calos apresentavam uma coloração branca e marrom e um aspecto compacto.

TABELA 10. EFEITO DE COMBINAÇÕES DE ANA E TDZ NA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES DE RADICULARES DE MOGNO APÓS 30 DIAS.

ANA (μM)	TDZ (μM)	% explantes com calos (N1/N2)
0	0	0 (0/120)
0,1	0,5	15 (18/120)
0,1	1,0	10 (12/120)
0,1	1,5	5 (6/120)

Quando os explantes foram subcultivados em meio com 0,6 μM de ANA e 0,5 μM de TDZ por 30 dias, observou-se que a quantidade de calos permaneceu a mesma, porém os calos existentes começaram a aumentar de volume e apresentaram uma coloração bege e um aspecto compacto (Figura 2K).

Nestes experimentos realizados com explantes radiculares, observou-se que os explantes colocados em meio de cultura MS acrescido de diferentes combinações de picloram (0,25; 0,5 e 1,0 μM) ou combinações de ANA (0,1 μM) e de TDZ (0,5; 1,0 e 1,5 μM), houve pouca formação de calos. A calogênese não diferiu significativamente em função dos níveis de picloram ou ANA e TDZ. Estes resultados corroboram os observados por ROCHA e QUOIRIN (2004), onde a obtenção de calos a partir de segmentos radiculares foi em baixa proporção em meios contendo outras combinações de auxina e citocinina como (2,3 μM de CIN e 0,54 μM de ANA) e (4,4 μM de BA e 0,54 μM de ANA).

Os poucos calos obtidos em ambos meios com picloram e com a combinação de ANA e TDZ, apresentavam uma coloração branca e marrom e um aspecto compacto. Observou-se que o uso dos fitorreguladores, tanto picloram como combinações de ANA e TDZ, foram favoráveis ao desenvolvimento dos calos, porém não foi adequado para que os calos se diferenciasssem em gemas, diferente do resultado obtido por Salvi *et al.*, (2001), que utilizaram explantes foliares e de raízes de *Azadirachta indica* e obtiveram brotos diretamente a partir de explantes cultivados em meio MS com 8,8 μM de BAP e 0,57 μM de ácido indolacético.

De acordo com GEORGE (1993), o balanço entre auxina e citocinina controla muitos aspectos da diferenciação celular e organogênese nas culturas de tecidos e órgãos. Altas concentrações de auxina combinada com baixas concentrações de citocinina, geralmente induzem à formação de raiz, enquanto baixas proporções de auxina com alta proporção de citocinina induzem à formação de brotos. Em meios com razões intermediárias de auxina/citocinina ocorre proliferação celular desorganizada, como calos.

5. CONCLUSÕES

A formação de calo é abundante nos explantes de epicótilos de mogno cultivados *in vitro*.

A indução de calogênese a partir de epicótilos esteve presente em todos os tratamentos com fitorreguladores, sendo observada em 55 a 100% dos explantes de epicótilos. Os calos obtidos apresentaram aspecto compacto e coloração bege e amarela.

No caso dos explantes radiculares, a calogênese foi baixa e foi observada em 5 a 25% dos explantes. Esses calos apresentaram em sua maioria aspecto compacto e coloração marrom.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fitorregulador picloram, mais freqüentemente usado na embriogênese somática, se torna uma alternativa para o desenvolvimento de calos.

As concentrações dos reguladores utilizadas para segmentos de epicótilo foram eficientes para a formação de calos, mas não para o desenvolvimento destes em órgãos.

Devido à baixa taxa de calogênese em explantes radiculares, outros fitorreguladores e combinações poderiam ser testados para melhor resultado.

O balanço hormonal propício ao desenvolvimento de gemas adventícias não foi, entretanto, encontrado. Para atingir este objetivo, outras combinações ou outros tipos de fitorreguladores precisam ser testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBARRÁN, J.G.; VIELMA, M.; CONTRERAS, G. I. Cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla*: Estudio de condiciones óptimas para la regeneración y transformación genética. **Revista Forestal Venezolana**, v. 41, n. 2, p. 111- 118, 1997.

BRASIL. Decreto número 3.559 de 14 de agosto de 2000. Suspende a exploração da espécie mogno (*Swietenia macrophylla*), na região Amazônica, pelo período de dois anos, e dá providência. **Diário Oficial da União**, Brasília, D.O.U. DIA 15/08/2000 SEÇÃO 1, p. 02.

BRASIL. Decreto número 6.472 de 5 de junho de 2008. Estabelecimento de critérios para exploração da espécie *Swietenia macrophylla* King (mogno). **Diário Oficial da União**, Brasília, D.O.U. DIA 06/06/2008, p.01.

BRUNETTA, J. M. F. C.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E.P. de. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido α -naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, n.71, p.19-24, 2006.

CARVALHO, P.E.R. **Mogno *Swietenia macrophylla***. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 12p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 140).

CARVALHO, J; LIMA, M.; AIRES, P.; VIDAL, M.; PIMENTEL, N. **Embriogênese Somática**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 35p. (Embrapa Algodão. Documentos, 152).

CERDAS, L. V.; DUFOUR, M.; VILLALOBOS, V. *In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). **Revista Biologia Tropical**, v.46, n.2, p.225-228, 1998.

COUTO, J. M.F. **Germinação e morfogênese *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2002.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed. Exegetics Limited, 1993.

GIAGNACOVO, G.; PASQUA, G.; MONACELLI, B.; VAN, S. A.; MACCIONI, O.; VITALI, F. Organogenesis and embryogenesis from callus cultures of *Azadirachta excelsa*. **Plant- Biosystems**, v.135, n. 1, p.13-18, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. p. 99-170. Brasília: Embrapa SPI/ Embrapa-CNPq, 1998.

GROGAN, J.; BARRETO, P.; VERISSIMO, A. **Mogno na Amazônia Brasileira: Ecologia e Perspectivas de Manejo**. Belém: Imazon, 2002.

GULLISON, R. E.; PANFIL, S. N. ; STROUSE, J. J.; HUBBELL, S. P. Ecology and management of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) in the Chimanes Forest, Beni. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Bolivia, v.122,p. 9-34.,1996.

HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PAQUES, M.; MARIEN, J.N.; BOUDET, A.M.; TEULIERES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, v.161. p.645-653, 2001.

HUSAIN, K.M.; ANIS, M. Rapid *in vitro* multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). **Acta Physiologia Plantarum**, v. 31, p.765–772, 2009.

JUNIOR, M. de. J. V. L.; GALVÃO, M. S. **Mogno *Swietenia macrophylla* King**. Informativo Técnico. Rede de Sementes da Amazônia, Nº 8, 2005

LEE, S.K.; RAO, A.N. Plantlet production of *Swietenia macrophylla* through tissue culture. **Garden Bulletin Singapore**, v.41, p.11-18, 1988.

MARUYAMA, E.; ISHII, K.; SAITO, A.; MIGITA, K. Screening of suitable sterilization of explants and proper media for tissue culture of eleven tree species of Peru-Amazon Forest. **Journal of Agriculture Science**, v.23, p.252-261. 1989.

MARUYAMA, E.; ISHII, K. **Tissue culture studies on big-leaf mahogany *Swietenia macrophylla***. Proceedings of the International Workshop BIOREFOR, Brisbane. p.116-118,1997.

MIRANDA, E. M. de; MIRANDA, K. R. de. **Propagação vegetativa do mogno (*Swietenia macrophylla* King) por enraizamento de estacas semilenhosas em câmara úmida**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000. 15p. (Embrapa Acre. Circular Técnica, 32).

MROGINSKI, E.; REY, H.Y.; MROGINSKI, L.A. *In vitro* plantlet regeneration from Australian Red Cedar (*Toona ciliata*, Meliaceae). **New Forests**, v. 25, p.177-184, 2003.

NETO, A. B. G.; FELFILI, J. M.; SILVA, G. F. da; MAZZEI, L.; FAGG, C. W.; NOGUEIRA, P. E. Avaliação do plantio homogêneo de mogno, *Swietenia macrophylla* King, em comparação com o plantio consorciado com *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake, após 40 meses de idade. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n.6, p. 777-784, 2004.

NUNES, E.C.; CASTILHO, C.V.de; MORENO, F.N.; VIANA, A.M. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 70, p.259-268, 2002.

PENA-RAMIREZ, J.Y.; JUAREZ-GOMEZ, J.; GOMEZ-LOPEZ L.; JERONIMO-PEREZ, L.; GARCIA-SHESENA, I.; GONZALEZ-RODRIGUES, J.A.; ROBERT, M.L. Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured *in vitro* using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 46, p.149–160, 2010.

ROCHA, S. C. da. **Controle de morfogênese de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivado *in vitro***. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

ROCHA, S. C. da; QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. **Ciência Florestal**, v. 14, p. 91-101, 2004.

SALVI, D. N.; SINGH, H.; TIVAREKAR, S.; EAPEN, S. Plant regeneration from different explants of neem. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 159-162, 2001.

SCHINOR, E. H.; PAOLI, L. G. de; AZEVEDO, F. A. de; FILHO, F. de A. A. M.; MENDES, B. M. J. Organogênese *in vitro* a partir de diferentes regiões do epicótilo de Citrus sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 463-466, 2006.

SHAJI, J.; SONIYA, E. V.; VALSALA, K.; NAIR, G. M. In vitro adventitious shoot formation from mature leaves and leaf derived calli of *Naregamia alata* W & A. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 35, p.1249-1251, 1997.

SRIVASTAVA, P.; SINGH, M.; MATHUR, P.; CHATURVEDI, R. *In vitro* organogenesis and plant regeneration from unpollinated ovary cultures of *Azadirachta indica*. **Biologia Plantarum**, v. 53, p. 360-364, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. de M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

VENKETESWARAN, S.; DIAS, M.; SULTANBAWA, F.; WEYERS, U. V. Tissue culture studies on mahogany tree, *Swietenia*. In: AHUJA, M.R. (Ed). **Somatic Cell Genetics of Woody Plants**, London: Kluwer Academic Publishers, 1988. p p. 147-153.

FIGURAS

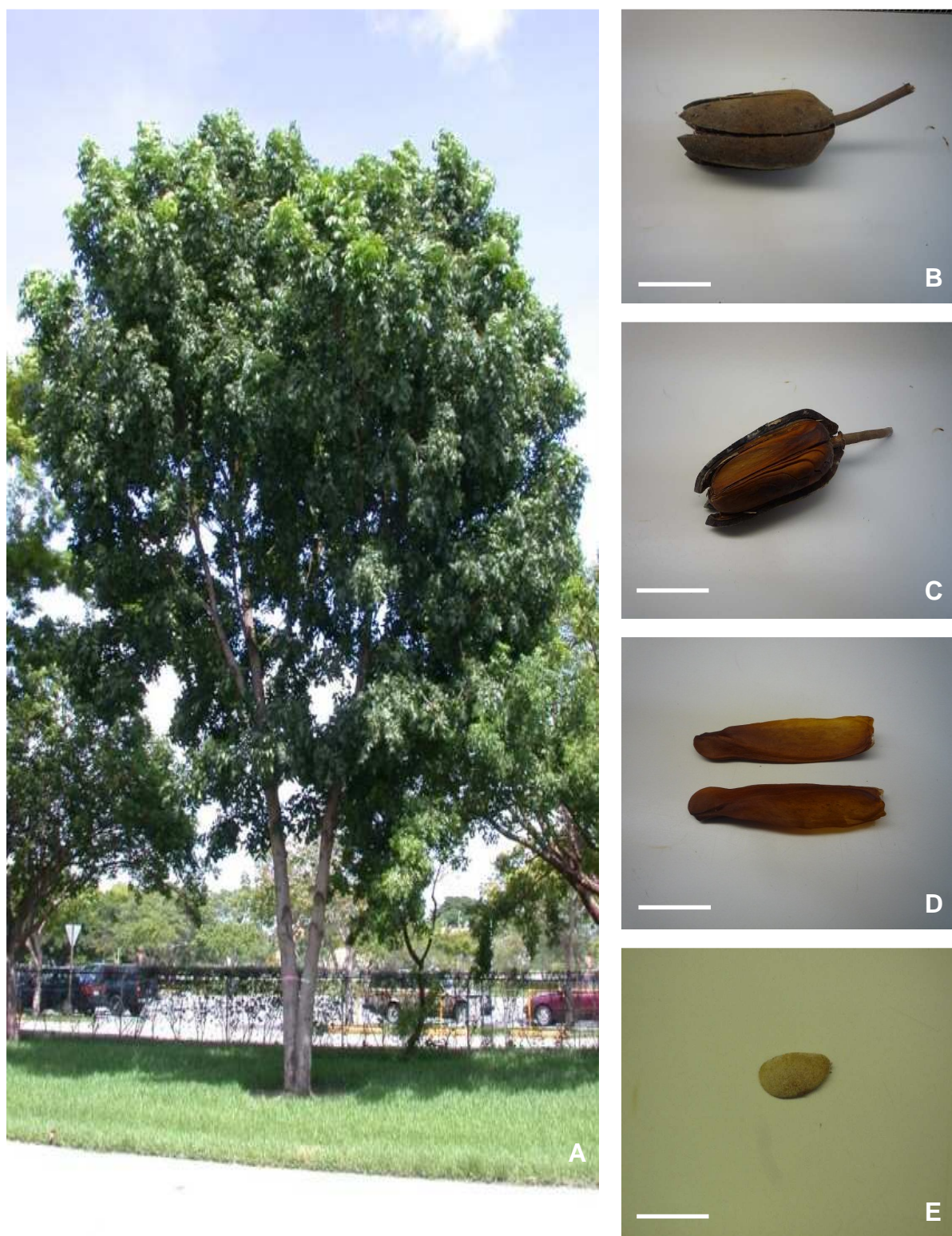


FIGURA 1 – *Swietenia macrophylla* King. A) Aspecto geral da árvore; B) Fruto. Barra: 4,4 cm. C-D) Sementes aladas. Barra: 4,4 cm; E) Semente sem tegumento. Barra: 2,2 cm

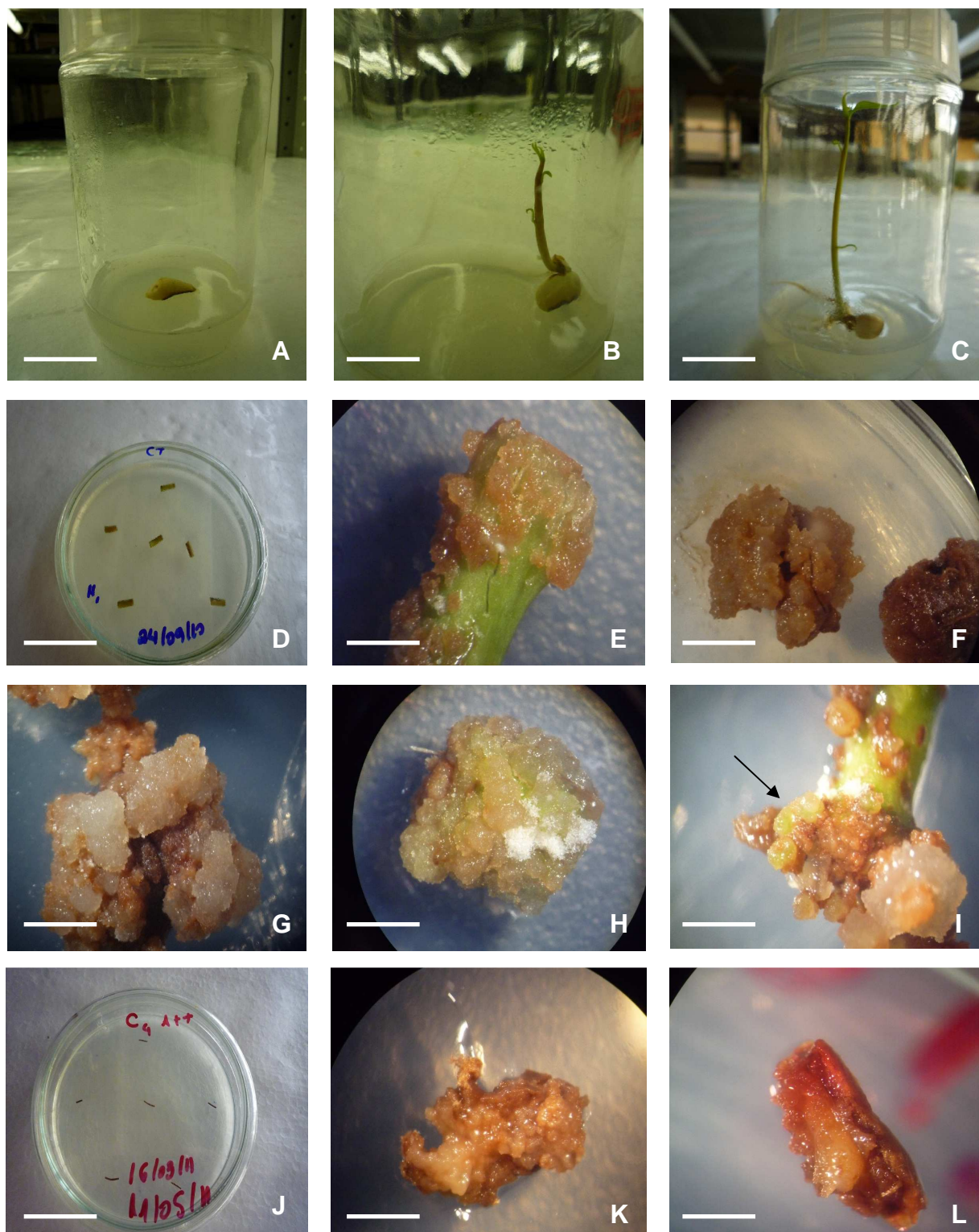


FIGURA 2 – A-C) Germinação *in vitro* de mogno: A) semente em meio MS. Barra: 2,4 cm; B) início de germinação da semente. Barra: 2,4 cm; C). plântula germinada *in vitro* após 30 dias. Barra: 3,0 cm. D-I) calogênese a partir de epicótilos: D) segmentos de epicótilo. Barra: 3,2 cm; E) início da calogênese. Barra: 0,36 cm; F) calo obtido em meio com 0,25 μM de picloram. Barra: 0,5 cm; G) calo obtido em meio com 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ. Barra: 0,5 cm; H) calo obtido em meio com 1,3 μM de ANA e 4,4 μM de BAP. Barra: 0,5 cm; I) aparecimento de calos verdes (seta) em meio com 0,1 μM de ANA e 2,2 μM de BAP. Barra: 0,5 cm. J-L) calogênese a partir de raízes: J) segmentos radiculares. Barra: 3,2 cm; K) calo obtido a partir de explantes radiculares em meio com 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ. Barra: 0,36 cm; L) calo obtido a partir de explantes radiculares em meio com 0,25 μM de picloram. Barra: 0,36 cm.

ANEXOS

ANEXO 1 - Análise de variância e teste de Bartlett para o efeito de diferentes concentrações de picloram na formação de calos em explantes de epicótilo de mogno após 30 dias.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	11.26213	3.75404	17.6327 *
Resíduo	24	5.10964	0.21290	
Total	27	16.37177		
Coeficiente de variação (%)			22.33828	
Teste de Bartlett (χ^2)			6.88586 ^{ns}	

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade. ^{ns} não significativo. G.L: grau de liberdade; S.Q: soma de quadrado; Q.M: quadrado médio; F: estatística do teste F.

ANEXO 2 - Análise de variância e teste de Bartlett para o efeito de diferentes concentrações de picloram na formação de calos em explantes de epicótilo de mogno após 60 dias.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	10.8928	3.63093	18.6993 *
Resíduo	24	4.66021	0.19418	
Total	27	15.55301		
Coeficiente de variação (%)			21.35465	
Teste de Bartlett (χ^2)			6.88586 ^{ns}	

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade. ^{ns} não significativo. G.L: grau de liberdade; S.Q:soma de quadrado; Q.M: quadrado médio; F: estatística do teste F.

ANEXO 3 - Análise de variância e teste de Bartlett para o efeito de diferentes concentrações de picloram na formação de calos em explantes de epicótilo de mogno após 30 dias.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	9.42754	3.14251	47.6912 *
Resíduo	32	2.10857	0.06589	
Total	35	11.53611		
Coeficiente de variação (%)			10.64704	
Teste de Bartlett (χ^2)			4.34574 ^{ns}	

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade. ^{ns} não significativo. G.L: grau de liberdade; S.Q:soma de quadrado; Q.M: quadrado médio; F: estatística do teste F.

ANEXO 4 - Análise de variância e teste de Bartlett para o efeito de diferentes concentrações de ANA e TDZ na formação de calos em explantes de epicótilo de mogno após 30 dias.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	7.69821	2.56607	14.2487 *
Resíduo	20	3.60182	0.18009	
Total	23	11.30002		
Coeficiente de variação (%)			20.83271	
Teste de Bartlett (χ^2)			4.87557 ^{ns}	

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade. ^{ns} não significativo. G.L: grau de liberdade; S.Q:soma de quadrado; Q.M: quadrado médio; F: estatística do teste F.

ANEXO 5 - Análise de variância e teste de Bartlett para o efeito de diferentes concentrações de ANA e TDZ na formação de calos em explantes de epicótilo de mogno após 60 dias.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	6.25130	2.08377	4.9882 *
Resíduo	32	13.36755	0.41774	
Total	35	19.61885		
Coeficiente de variação (%)			32.40927	
Teste de Bartlett (χ^2)			6.16444 ^{ns}	

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade. ^{ns} não significativo. G.L.: grau de liberdade; S.Q.:soma de quadrado; Q.M: quadrado médio; F: estatística do teste F.

ANEXO 6 - Análise de variância e teste de Bartlett para o efeito de diferentes concentrações de ANA e TDZ na formação de calos em explantes de epicótilo de mogno após 90 dias.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	14.28925	4.76308	19.5275 *
Resíduo	32	7.80533	0.24392	
Total	35	22.09458		
Coeficiente de variação (%)			22.05510	
Teste de Bartlett (χ^2)			3.29497 ^{ns}	

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade. ^{ns} não significativo. G.L.: grau de liberdade; S.Q.:soma de quadrado; Q.M: quadrado médio; F: estatística do teste F.

ANEXO 7 - Análise de variância e teste de Bartlett para o efeito de diferentes concentrações de ANA e TDZ na formação de calos em explantes de epicótilo de mogno após 30 dias.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	3.17029	1.05676	28.1509 *
Resíduo	20	0.75078	0.03754	
Total	23	3.92107		
Coeficiente de variação (%)			9.68353	
Teste de Bartlett (χ^2)			3.86794 ^{ns}	

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade. ^{ns} não significativo. G.L.: grau de liberdade; S.Q.:soma de quadrado; Q.M: quadrado médio; F: estatística do teste F.

ANEXO 8 - Análise de variância e teste de Bartlett para o efeito de diferentes concentrações de picloram na formação de calos em explantes radiculares.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	3	2.52021	0.84007	1.2876 ^{ns}
Resíduo	36	23.48750	0.65243	
Total	39	26.00771		
Coeficiente de variação (%)			55.26091	
Teste de Bartlett (χ^2)			0.90338 ^{ns}	

^{ns} não significativo. G.L.: grau de liberdade; S.Q.:soma de quadrado; Q.M: quadrado médio; F: estatística do teste F.